

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТРОМБОЦИТАРНЫХ АНТИТЕЛ У БЕРЕМЕННЫХ И НОВОРОЖДЕННЫХ

Минеева Н.В., Заварзина О.А., Сумская Г.Ф., Гавровская С.В.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Российский НИИ Гематологии и Трансфузиологии» ФМБА РФ; 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16; факс: 717-25-50; 274-92-27; RNIIGT@mail.ru

Резюме.

Неонатальная тромбоцитопения может иметь иммунную природу и быть результатом разрушения тромбоцитов ребенка антителами матери, направленными на антигены тромбоцитов, унаследованные от отца, а также может вызываться антитромбоцитарными аутоантителами матери.

Цель работы заключалась в оценке частоты встречаемости антитромбоцитарных антител у беременных с тромбоцитопениями различной степени выраженности и у новорожденных с неонатальной тромбоцитопенической пурпурой, а так же в выяснении ауто- или аллоиммунной природы этих антител.

Выявление ауто- и аллоантител проводили в образцах крови 347 беременных, состоящих на учёте в гематологическом центре при роддоме № 6 г. Санкт-Петербурга, и в образцах крови 235 детей с тромбоцитопенией, находящихся на лечении в 1 Детской Городской клинической больнице г. Санкт-Петербурга. Количество тромбоцитов у беременных и рожениц колебалось от 50 до $150 \times 10^9/\text{л}$, у новорожденных – от 20 до $150 \times 10^9/\text{л}$. Для определения антитромбоцитарных антител применяли метод твёрдофазной адгезии на плашках. Проведенный нами скрининг антитромбоцитарных аутоантител выявил высокий уровень (35,5%) аутоенсибилизации у беременных с тромбоцитопениями. Также высокий процент иммунизации (34,5%) был выявлен у обследованных детей с тромбоцитопенией, в том числе у детей первого года жизни (39,1%). Исследовано шесть случаев неонатальной тромбоцитопении. Установлено, что в четырех случаях тромбоцитопения у детей обусловлена аутоантителами матери, в одном случае – аллоантителами и в одном случае – сочетанным присутствием ауто- и аллоантител.

Проведено типирование антигенов тромбоцитов методом ПЦР в реальном времени у 4-х супружеских пар, имеющих детей с тромбоцитопенией, для определения специфичности антитромбоцитарных аллоантител, выявленных при исследовании. Установлено, что причиной тромбоцитопении являлись антитромбоцитарные антитела

специфичности анти-HPA-3b, -5b, -3a. Полученные данные свидетельствуют, что неонатальная тромбоцитопеническая пурпура может быть вызвана как антитромбоцитарными аутоантителами матери, так и антителами матери, направленными на антигены тромбоцитов ребёнка, унаследованными от отца, поскольку оба вида этих антител принадлежали к классу иммуноглобулинов G.

Ключевые слова: антитромбоцитарные антитела, неонатальная аутоиммунная тромбоцитопения, антигены тромбоцитов человека.

THE PLATELET ANTIBODY DETECTION AMONG PREGNANT WOMEN AND NEWBORN

Mineeva N.V., Zavarzina O.A., Sumskaya G.F., Gavrovskaya S.V.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology

Abstract.

Neonatal thrombocytopenia can be caused either maternal platelet antibodies directed against fetal platelet antigens inherited from his farther or platelet autoantibodies of mother having autoimmune disorder and thrombocytopenia. For detection allo- and autoantibodies 347 blood samples of pregnant women (platelet count, less than $150 \times 10^9/L$) referred to us from St.Petersburg Haematological Delivery Center and 235 blood samples of children with thrombocytopenia (platelet count, less than $100 \times 10^9/L$) referred to us from First Pediatric Hospital of St.Petersburg were used. The solid-phase assay was made for antibody detection. Platelet autoantibodies were found among 35,5% pregnant women having thrombocytopenia and among 34,5% children. PCR typing of platelet antigens and detection of antibody was conform that the anti-HPA-3b, -5b, -3a antibodies caused the alloimmune thrombocytopenia among 4 fetus. As result, our investigation shows that neonatal thrombocytopenia can be caused either platelet autoantibodies transmitted from mother having autoimmune disorder or platelet alloantibodies directed against fetal platelet antigens inherited from his farther.

Key words: platelet antibodies, neonatal autoimmune thrombocytopenia, human platelet antigens.

Введение.

Тромбоцитопения характеризуется снижением количества тромбоцитов и может вызываться различными причинами. Кроме разрушения тромбоцитов в ходе иммунного ответа или недостаточного их образования, вызванного генетическими отклонениями, снижение количества тромбоцитов может быть обусловлено выработкой тромбоцитарных антител. При аутоиммунной тромбоцитопении разрушение тромбоцитов происходит за счёт выработки аутоантител, направленных против наиболее распространённых тромбоцитарных антигенов, расположенных на гликолипидах Пб/IIIa и Ib/IX, при аллоиммунной тромбоцитопении разрушение происходит за счет аллоантител, индуцированных тромбоцитарными антигенами [1]. Лечение аутоиммунных и аллоиммунных тромбоцитопений различно: применение трансфузий при аутоиммунных тромбоцитопениях неэффективно, а при аллоиммунных – перспективно, поэтому выявление природы антител остаётся важным вопросом при диагностике тромбоцитопений [2].

Данные литературы свидетельствуют, что неонатальная тромбоцитопения чаще имеет аллоиммунную природу. Встречаемость аллоиммунной тромбоцитопении новорожденных, по данным зарубежных авторов, составляет 1 случай на 800 - 2000 родов [3,4]. Патогенез неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении (НАТП) аналогичен патогенезу гемолитической болезни новорожденных и обусловлен иммунологическим конфликтом мать-плод по аллоантигенам. Также как и при гемолитической болезни новорожденных, мать иммунизируется антигеном плода, который унаследован от отца и отсутствует у матери, что приводит к выработке антител класса IgG. Плацентарный перенос IgG антител от матери к плоду может привести к тяжелой тромбоцитопении плода уже к 16-ой неделе беременности. Наиболее часто в клинической практике за рубежом наблюдается несовместимость по НРА-1a (Human platelet antigen – антиген тромбоцитов человека), встречаемость которого у белых европейцев составляет 97,5%. По другим данным, НРА-1a антитела вызывают НАТП в 78%-81%, а в 10%-19% случаев причиной неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении являются антитела НРА-5b [5-7].

В отличие от гемолитической болезни новорожденных, обусловленной несовместимостью по антигену D системы Резус, аллоиммунная тромбоцитопения часто наблюдается уже у первого ребенка, при этом последующие дети обычно страдают более тяжелой формой тромбоцитопении. Клиническими признаками аллоиммунной тромбоцитопении являются внутричерепные геморрагии, приводящие к серьезным неврологическим отклонениям или смерти. Внутричерепные кровоизлияния наиболее часто наблюдаются сразу после родов, но в

10% случаев могут случиться внутриутробно. Продолжительность тромбоцитопении у новорожденного обычно составляет 1-2 недели, но может достигать до 6 недель. При наличии кровотечений необходима своевременная терапия, адекватность которой зависит от степени тяжести тромбоцитопении.

Неонатальная тромбоцитопения может иметь и аутоиммунную природу. В литературе описаны случаи тромбоцитопении новорожденных, вызванной трансплацентарным переходом к ребенку аутоантител класса IgG от матери, больной аутоиммунной тромбоцитопенической пурпурой [2]. Кроме того, аутоиммунная тромбоцитопения у матери опасна тем, что может вызвать акушерские кровотечения вследствие снижения тромбоцитов в крови из-за разрушения их аутоантителами. Уменьшение количества тромбоцитов может быть связано и с их усиленным потреблением и недостаточным образованием, однако наиболее частой причиной все-таки является разрушение их аутоантителами.

За рубежом исследования аспектов тромбоцитарной иммунологии ведутся в течение длительного времени, что позволяет осуществлять более точную лабораторную диагностику и идентификацию антител при аллоиммунной тромбоцитопении и выбирать верную тактику ведения сенсibilизированных беременных и лечения неонатальной тромбоцитопении [7,8].

Поскольку в настоящее время в России не проводится скрининг тромбоцитарных аллоантител во время беременности, большинство случаев неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении диагностируется только после рождения из-за развившейся пурпуры или кровотечений, таких как внутричерепные, приводящих к смерти или тяжелым неврологическим последствиям у детей.

Цель работы состояла в оценке частоты встречаемости антитромбоцитарных антител у беременных с тромбоцитопениями различной выраженности, а также у новорожденных с неонатальной тромбоцитопенией и выявлении ауто- или аллоиммунной природы этих антител.

Материалы и методы.

Для исследования использовали образцы крови 347 беременных, состоящих на учёте в гематологическом центре при роддоме № 6 г. Санкт-Петербурга, и образцы крови 235 детей, находящихся на лечении в 1 Детской Городской Клинической больнице г. Санкт-Петербурга, имеющих тромбоцитопению в анамнезе. Количество тромбоцитов у беременных и рожениц колебалось от 50 до $150 \times 10^9/\text{л}$, у новорожденных – от 20 до $150 \times 10^9/\text{л}$.

Антитела выявляли в плазме венозной крови, заготовленной на 5% К-ЭДТА. Для определения ауто- и аллоантител применяли метод твёрдофазной адгезии на плашках [10].

При определении аутоантител плазма пациента наносилась в веронал-обработанные ячейки, тромбоциты осаждались центрифугированием и отмывались 0,15М фосфатным

буфером. Для визуализации результатов к тромбоцитам добавляли тест-эритроциты, покрытые анти-IgG антителами. Если тест-эритроциты распределялись равномерно по ячейке и образовывали ровный слой, результат расценивался как положительный, если оседали на дне ячейки в виде точки - результат расценивался как отрицательный.

При выявлении аллоантител плазму донора вносили в веронал-обработанные ячейки микропланшетки, тромбоциты осаждали центрифугированием и отмывали 0,15М фосфатным буфером, затем добавляли в ячейки сыворотку пациента. После инкубации и отмывания плашек результат оценивался таким же образом, как при исследовании аутоантител.

Для постановки контроля специфичности реакции использовали плазму несенсибилизированных доноров-мужчин возрастом до 21 года, не имеющих гемотрансфузий в анамнезе.

Типирование НРА-1, -2, -3, -4, -5, -15 проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора ТромбоГенТест [11].

Результаты.

Исследование аутоантител к тромбоцитам проводилось у 347 женщин на различных сроках беременности, имеющих тромбоцитопению в анамнезе. У 123 из них (35,5%) были выявлены антитромбоцитарные аутоантитела класса IgG. Наиболее часто антитела выявлялись на сроках от 20 до 33-39 недель беременности.

Обследование 235 детей с острой и хронической тромбоцитопенической пурпурой и тромбоцитопениями различной степени тяжести показало, что у 81 ребенка (34,5%) были выявлены тромбоцитарные аутоантитела. На первом году жизни было обследовано 23 ребёнка. У 9 из них (39,1%) были выявлены антитромбоцитарные аутоантитела.

Кроме того, было проведено исследование на наличие антител к тромбоцитам у шести женщин, родивших детей с признаками тромбоцитопении:

1. Беременной Л. за год до беременности был поставлен диагноз аутоиммунная тромбоцитопения. Во время беременности на 31, 34, 37 неделе выявлены антитромбоцитарные аутоантитела, проводилась гормональная терапия. У дочери на пятый день после рождения количество тромбоцитов составляло $21 \times 10^9/\text{л}$, на седьмой день - $46 \times 10^9/\text{л}$, антитромбоцитарные ауто- и аллоантитела у ребенка выявлены не были. Таким образом, вероятно, снижение количества тромбоцитов у ребенка произошло за счет трансплацентарной передачи тромбоцитарных аутоантител матери во время вынашивания.

2. У новорожденного М. на 6 день жизни была обнаружена острая тромбоцитопеническая пурпура (количество тромбоцитов менее $30 \times 10^9/\text{л}$). Выявлены аутоантитела на тромбоцитах матери и на тромбоцитах ребёнка. Так как аллоантитела в крови матери не были обнаружены, можно предположить, что и в данном случае болезнь новорожденного была вызвана аутоантителами матери, перешедшими через плаценту.

3. У новорожденного З. на 2-й день после рождения количество тромбоцитов составило $30 \times 10^9/\text{л}$. Аллоантитела в сыворотке крови матери не были выявлены. У матери были обнаружены аутоантитела к тромбоцитам класса IgG, которые, возможно, и явились причиной тромбоцитопении у ребенка.

4. У беременной Н. диагноз аутоиммунная тромбоцитопения был поставлен до беременности. На 22 неделе выявлены антитромбоцитарные аутоантитела. После родов у дочери обнаружена тромбоцитопения (количество тромбоцитов менее $100 \times 10^9/\text{л}$) и выявлены аутоантитела к тромбоцитам. На 7-й день жизни у ребенка количество тромбоцитов достигло нормы, что свидетельствует о том, что выявленные у ребенка антитела были аутоантителами матери, перешедшими через плаценту.

5. У новорожденного К. на 7 день жизни была обнаружена тромбоцитопения неясного генеза. Количество тромбоцитов составляло менее $50 \times 10^9/\text{л}$. Аутоантитела ни у ребёнка ни у матери не выявлены. В крови матери выявлены аллоантитела к антигенам тромбоцитов ребёнка, исследование специфичности которых не проводилось. Таким образом, тромбоцитопения у новорожденного, вероятно, обусловлена антитромбоцитарными аллоантителами, выработавшимися у матери во время беременности и переданных ребёнку трансплацентарно и/или во время грудного вскармливания.

6. Новорожденная П. до 2,5 месяцев была на грудном вскармливании. За это время тромбоцитопения прогрессировала с $62 \times 10^9/\text{л}$ до $40 \times 10^9/\text{л}$. У матери были выявлены антитромбоцитарные аутоантитела и аллоантитела. Определение специфичности аллоантител не проводилось. В данном случае трудно установить, какие антитела матери, ауто- или алло, перешедшие к ребёнку, вызвали тромбоцитопению у ребенка.

В последующих исследованиях нами для установления специфичности антител, вызвавших иммунологический конфликт мать-ребенок по антигенам тромбоцитов, проводилось ДНК типирование НРА-1, -2, -3, -5, -15 методом ПЦР в режиме реального времени. Выявленные расхождения НРА у матери и отца и/или ребенка позволяли сделать вывод о специфичности обнаруженных антител к антигенам тромбоцитов. У четырех

супружеских пар, имеющих детей с тромбоцитопенией, удалось определить специфичность антител.

1. Пациентка С., в анамнезе 2 внутриутробные смерти плода. Количество тромбоцитов в норме. В сыворотке крови были выявлены аллоантитела класса IgG к антигенам тромбоцитов отца. По результатам ДНК типирования образцов крови матери и отца специфичность этих антител определена как анти-НРА-3b.

2. Новорожденный Л., возраст 1 месяц, с острой тромбоцитопенической пурпурой, количество тромбоцитов $10 \times 10^9/\text{л}$. В сыворотке крови матери были выявлены IgG антитела к антигенам тромбоцитов отца. По результатам ДНК типирования образцов крови матери и отца специфичность этих антител определена как анти-НРА-3b и анти-НРА-5b.

3. Беременная К., количество тромбоцитов $120 \times 10^9/\text{л}$. В сыворотке крови были выявлены антитела класса IgG к антигенам тромбоцитов мужа. По результатам ПЦР типирования антигенов тромбоцитов матери и отца специфичность этих антител определена как анти-НРА-3a.

4. Беременная С., количество тромбоцитов $100 \times 10^9/\text{л}$. В сыворотке крови были выявлены антитела класса IgG к антигенам тромбоцитов мужа. По результатам генотипирования образцов крови матери и отца специфичность этих антител определена как анти-НРА-3b.

Таким образом, в нашем исследовании у женщин были выявлены антитромбоцитарные антитела специфичности анти-НРА-3b, анти-НРА-3a, анти-НРА-5b, которые явились причиной аллоиммунной тромбоцитопении у их детей.

Обсуждение.

По данным зарубежных авторов тромбоцитопения различного происхождения встречается у 10% беременных. Иммунная тромбоцитопения может не только осложниться кровотечениями у женщин, но и привести к НАТП. В России отсутствуют данные о выявляемости ауто- и аллоантител к антигенам тромбоцитов у беременных, также отсутствуют сведения о выявляемости антител у новорожденных и детей с тромбоцитопениями.

Проведенный нами скрининг аутоантител к тромбоцитам выявил высокий уровень аутоенсибилизации (35,5%) у беременных с тромбоцитопениями. Также высокий процент аутоенсибилизации (34,5%) был выявлен у обследованных детей с тромбоцитопенией.

Определение специфичности тромбоцитарных аллоантител, проведенное нами в четырех случаях с учетом результатов ДНК типирования матери и отца, показало, что причиной тромбоцитопении являлись анти-HPA-3b, -5b, -3a антитела. Эти данные отличались от результатов, полученных зарубежными авторами, свидетельствующих о большом значении анти-HPA-1a антител [7-9]. Определенные сложности с получением образцов крови новорожденных и их отцов не позволили нам провести исследования большего количества супружеских пар. Поэтому для окончательных выводов о роли антигенов тромбоцитов определенной специфичности в развитии НАТП среди населения России необходимы дальнейшие исследования и анализ большего количества случаев.

Полученные нами данные подтверждают, что неонатальная тромбоцитопеническая пурпура может быть вызвана как ауто-, так и аллоантителами матери, направленными к антигенам тромбоцитов ребёнка, поскольку оба вида этих антител принадлежат к классу иммуноглобулинов G, и проходят через плаценту. Поэтому при исследовании НАТП необходима диагностика тромбоцитарных как ауто- так и аллоантител.

Серьёзность последствий иммунной тромбоцитопении у детей требует новых исследований в этой области, разработки и усовершенствования методов выявления антитромбоцитарных антител для правильного антенатального и неонатального ведения таких пациентов.

Литература.

1. Зотикова, Е.А. Тромбоциты и антитромбоцитарные антитела / Е.А. Зотикова, А.Г. Бабаева, Л.Л. Головкина - М.: Монолит.- 2003.- 128 с.
2. Масчан, А.А. Иммуно-опосредованные тромбоцитопении новорожденных: дифференциальный диагноз и принципы терапии / А.А. Масчан, А.Г. Румянцев // Вопросы гемат./онкол. и иммунопатологии в педиатрии- 2010.- Т.9.- № 3.-С. 3-7.
3. Muniz-Diaz, E. Diagnostic evaluation of FNAIT / E.Muniz-Diaz //Vox Sang. - 2007. - v.2. - n.1. –P.48-55. ISBT Science Series.
4. Kaplan, C. Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: a 50-year story / C. Kaplan // Immunohematol.- 2007.- v.23.- № 1.-P. 9-13.
5. Davore, A. Human platelet antigen-specific alloantibodies in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia / A. Davoren, B.R. Curtis, R.H. Aster, J.G. Mc. Farland// Transfusion.- 2004.- v. 44.- P.1220-1225.
6. Marin, L. Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b, HLA antibodies / L. Marin, A. Torio, M. Muro, R. Fernandez-Parra,

- A. Minguela, V. Bosch, M.R. Alvarez-Lopez, A.M. Garcia-Alonso // *Pediatr.Allergy.Immunol.*- 2005.- v.16.- P.279-282.
7. Allen, D. Interlaboratory variation in the detection of HPA-specific alloantibodies and in molecular HPA typing / D. Allen, W.H. Ouwehand, M. de Haas, R. Kekomaki, C. Kaplan, P. Metcalf // *Vox. Sang.*- 2007.- v. 93.- P. 316-324.
8. Evi, Stavrou. Immune Thrombocytopenia in Pregnancy *Hematol Oncol.* / Stavrou. Evi, R. Keith, Mc.Crae// *Clin North Am.*- 2009.- December.- v.- 23.-№ 6.-P.1299–1316.
9. Bertrand, G. Prediction of the fetal status in non-invasive management of alloimmune thrombocytopenia / G. Bertrand, G. Drame, C. Martageix, C. Kaplan // *Blood.*- 2011.- т. 117(II).- P.3209-3213.
10. Минеева, Н.В. Метод выявления антител к антигенам тромбоцитов / Н.В. Минеева, М.Н. Блинов, О.А. Заварзина, Е.В. Елхина, Н.Н. Бодрова, С.И. Капустин, Л.С. Приезжева, И.В. Поединенко // *Трансфузиология.* -2007.- № 1-2. - С.47-48.
11. Минеева, Н.В. Типирование антигенов тромбоцитов доноров и пациентов методом ПЦР в реальном времени / Н.В. Минеева, А.А. Ёлов, В.В. Бурыйлёв, С.В. Гавровская, В.Н. Чеботкевич // *www. Medline.ru* - т. 12. - *Трансфузиология.*-2011.-С.936-947.